

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P9271Dr. B/La	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 97/ 01590	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/03/1997
(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 28/03/1996	
Anmelder GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND... et al.	

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

- ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
- ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
- ☒ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
 - ☒ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
 - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
 - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
 - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

- ☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.

**PROTEIN MIT DIFFERENZIERUNGSINDUZIERENDER AKTIVITÄT FÜR
FRIEND-ERYTHROLEUKAMIEZELLINIEN**

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

- Abb. Nr. _____
- ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
 - ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
 - ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.
- ☒ keine der Abb.

.HEADLINE

ATCC CCL-243

K-562 (Chronic myelogenous leukemia, human)

.TEXT

Current medium for propagation: RPMI 1640, 90%; FBS, 10%.

The continuous cell line K-562 was established by Lozzio and Lozzio (Blood 45: 321-334, 1975) from the pleural effusion of a 53-year-old female with chronic myelogenous leukemia in terminal blast crises. The cell population has been characterized as highly undifferentiated and of the granulocytic series (Leukemia Res. 3: 363-370, 1979). Studies conducted by Anderson, et al., (Int. J. Cancer 23: 143-147, 1979) on the surface membrane properties led to the conclusion that the K-562 was a human erythroleukemia line. The effect of inducers on sublines derived from the original K-562 cell line have been reviewed by Koeffler and Golde (Blood 56: 344-350, 1980). More recent studies indicate that the K-562 blasts are multipotential, hematopoietic malignant cells that spontaneously differentiate into recognizable progenitors of the erythrocytic, granulocytic and monocytic series (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 166: 546-550, 1981).

The K-562 cell line has attained widespread use as a highly sensitive in vitro target for the natural killer assay (J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 59: 77-83, 1977). Cultures from the ATCC stock have been shown to exhibit this sensitivity for assessing human natural killer activity.

Karyological studies on various K-562 sublines have been classified into three groups (A,B,C) by Dimery, et al., (Exp. Hematol. 11: 601-610, 1983). The strain obtained by the ATCC most closely resembles the B population. Occurrence of the Philadelphia chromosome, however, was of much lower frequency; none detected in 15 metaphases examined.

DESCRIPTION OF REPOSITORY REFERENCE SEED STOCK

Number of Serial Subcultures from Tissue of Origin: Unknown.

Freeze Medium: Culture medium, 95%; dimethyl sulfoxide (DMSO), 5; antibiotic-free.

Viability: Approximately 85% (dye exclusion).

Culture Medium: RPMI medium 1640, 90%; FBS, 10%; antibiotic-free.

Growth Characteristics of Thawed Cells: An inoculum of 1-2 X 10(5) viable cells/ml in the above culture medium at 37C results in a doubling time of 26-30 hrs over a 5- to 7-day period provided fresh medium is added at 48-72 hr intervals.

Plating Efficiency: The cells cannot be plated.

Morphology: Lymphoblast-like.

Karyology: Chromosome Frequency Distribution 50 Cells: 2n = 46
ells: 1 1 10 12 7 13 3 2 1

Chromosomes: 64 65 66 67 68 69 70 72 77

The stemline chromosome number is triploid with the 2S component occurring at 4.2%. Fifteen markers (M1 and M(15)) occurred in nearly all S metaphases. Spontaneous non-specific dicentrics occurred, but rarely. Unstable markers were also rarely seen. The X was disomic, and N9 was nullisomic.

Sterility: Tests for mycoplasma, bacteria, fungi, protozoa and viruses were negative.

Species: Confirmed as human by isoenzymology.

Tumorigenicity: Tumors developed in 30-35 days at 33 1/3% frequency (2/6) in nude mice inoculated subcutaneously with 10(7) cells.

EBNA: Negative.

Reverse Transcriptase: Not detected.

Erythrocyte Rosette Test: E, 1%; EA, 34%; EAC, 2%.

HLA Profile: Not detected.

Isoenzymes: AK1, 1; ES D, 1; GLO-1, 2; G6PD, B; PGM1, 0; PGM3, 1; Me-2, 0.

Submitted by: H.T. Holden, NCI, NIH, Bethesda, MD.

Prepared and characterized by: ATCC, Rockville, MD.

Price Code: J

.HEADLINE

ATCC TIB-68

WEHI-3 (Myelomonocyte, mouse)

.TEXT

Passage Frozen: Unknown. Current medium for propagation: Iscove's modified Dulbecco's medium with 2-mercaptoethanol, 10(-5)M, 90%; FBS, 10%. Additional Information: This macrophage-like line was derived from a BALB/c mouse. Growth of these myelomonocytic leukemia cells is inhibited by concentrations of LPS as low as 4.0 ng/ml and blocked completely at higher concentrations. Dextran sulfate also inhibits growth at concentrations of 30-40 mcg/ml. Production of the constitutive enzyme lysozyme and of granulocyte colony-stimulating activity (CSA) by WEHI-3 is unaffected or actually enhanced during inhibition of cell growth. Latex beads are phagocytized but not toxic. Zymosan and BCG are also phagocytized and block growth. The cell surface bears receptors for immunoglobulin and complement. WEHI-3 exhibits only weak effector activity against sheep erythrocytes or the tumor target EL-4 in an antibody-dependent cell mediated cytotoxic system. References: Cancer Res. 37: 546-550, 1977; J. Immunol. 119: 950-954, 1977; J. Exp. Med. 143: 1528-1533, 1976; *ibid.*, 154: 1419-1431, 1981. Submitted by: Laboratory of M. Cohn, Salk Institute, La Jolla, CA.
Price Code: J

DUPLIKAT

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

GSF-Institut für
Experimentelle Hämatologie
Marchioninstr. 25
8000 München 70

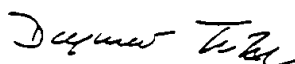
DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

und Zellkulturen GmbH

U. W. 11.02.92

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG

ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
<p>Name: GSF-Institut für Experimentelle Hämatologie Adresse: Marchioninstr. 25 8000 München 70</p>	<p>Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugestellte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2056 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung¹: 1993-01-27</p>
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
<p>Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1993-01-27² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus</p> <p>(X)³ lebensfähig ()³ nicht mehr lebensfähig</p>	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHFÜHRT WORDEN IST ⁴	
IV. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSM DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1993-02-12</p>

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

³ Zutreffendes ankreuzen.

⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren

DUPLIKAT

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
und Zellkulturen GmbH. 11.02.97

GSF-Institut für
Experimentelle Hämatologie
Marchioninistr. 25
8000 München 70

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugestelltes Bezugszeichen: L8815	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugestellte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2056
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>() eine wissenschaftliche Beschreibung</p> <p>(X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1993-01-27 (Datum der Ersthinterlegung)¹ eingegangen ist.</p>	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
<p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am _____ eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Adresse: Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>Dejmar Tula</i></p> <p>Datum: 1993-02-12</p>

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.
Formblatt DSM-BP/4 (einige Seiten) 0201

Literatur

Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-159 (1987)

Cullen BR: Use of eukaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes., pp 684-704. In: Methods in enzymology, vol. 152: Guide to molecular cloning techniques (eds. Berger SL, Kimmel AR), Academic Press, New York, 1987

Dexter TM, Garland J, Scott D, Scolnick E, Metcalf D: Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines. J. Exp. Med. 152, 1036 (1980)

Dube SK, Pragnell IB, Kluge N, Gaedicke G, Steinheider G, Ostertag W: Induction of endogenous and of spleen focus-forming viruses during dimethylsulfoxide-induced differentiation of mouse erythroleukemia cells transformed by spleen focus-forming virus. Proc Nat. Acad. Sci. USA 72, 1863-1867 (1975)

Falk MH, Hültner L, Milner A, Gregory CD, Bornkamm GW: Irradiated fibroblasts protect Burkitt lymphoma cells from apoptosis by a mechanism independent of BCL-2. Int. J. Cancer 55, 485-491 (1993)

Farrar JJ, Howard M, Fuller-Farrar J, Paul WE: Biochemical and physiochemical characterization of mouse B cell growth factor: a lymphokine distinct from interleukin 2. J. Immunol. 131, 1838-1842 (1983)

Greenberger JS, Eckner RJ, Sakakeeny M, Marks p, Reid D, Nabel D, Hapel A, Ihle JN, Humphries C: Interleukin 3-dependent hemopoietic progenitor cell lines. Fed. Proc. 42, 2762 (1983)

Guilbert LJ, Iscove NN: Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. *Nature* 263, 594-595 (1976)

Hanahan D: Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580 (1983)

Holmes KL, Palaszynski E, Frederickson TN, Morse III HC, Ihle JN: Correlation of cell-surface phenotype with the establishment of interleukin 3-dependent cell lines from wild-mouse murine leukemia virus-induced neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6687-6691 (1985)

Hültner L, Moeller J, Schmitt E, Jäger G, Reisbach G, Ring J, Dörmer P: Thiol-sensitive mast cell lines derived from mouse bone marrow respond to a mast cell growth enhancing activity different from both IL-3 and IL-4. *J. Immunol.* 142, 3340-3446 (1989)

Ihle JN, Rein A, Mural R: Immunological and virological mechanisms in retrovirus induced murine leukemogenesis. In: *Advances in viral oncology*, vol. 4 (G Klein, ed.), 95-137, Raven Press, New York 1984

Inoue H, Nojima H, Okayama H: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28 (1990)

Lemoine FM, Humphries RK, Abraham SDM, Krystal G, Eaves CJ: Partial characterization of a novel stromal cell-derived pre-B cell growth factor active on normal and immortalized pre-B cells. *Exp. Hematol.* 16, 718- (1988)

Lenoir GM, Vuillaume M, Bonnardel C: The use of lymphomatous and lymphoblastoid cell lines in the study of Burkitt's lymphoma. *IARC Sci. Publ.* 59, 309-318 (1985)

Lozzio CB, Lozzio BB: Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. Blood 45, 321-334 (1975)

Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immunol. Methods 65, 55-63 (1983)

Okayama H, Berg P: High-efficiency cloning of full-length cDNA. Mol. Cell. Biol. 2, 161-170 (1982)

Ostertag W, Melderis H, Steinheider G, Kluge N, Dube S: Synthesis of mouse haemoglobin and globin mRNA in leukaemic cell cultures. Nature New Biol. 239, 231-234 (1972)

Ostertag W, Crozier T, Kluge N, Melderis H, Dube S: Action of 5-bromodeoxyuridine on the induction of haemoglobin synthesis in mouse leukaemia cells resistant to 5-BUdR. Nature New Biol. 243, 203-205 (1973)

Ostertag W, Roesler G, Krieg CJ, Kind J, Cole T, Crozier T, Gaedicke G, Steinheider G, Kluge N, Dube S: Induction of endogenous virus and of thymidine kinase by bromodeoxyuridine in cell cultures transformed by Friend virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4980-4985 (1974)

Ovejera AA, Houchens DP, Catane R, Sheridan MA, Muggia FM: Efficacy of 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine and N-[N-γ-Glutamyl-6-diazo-5-oxo-norleucinyl]-6-diazo-5-oxo-norleucine against experimental tumors in conventional and nude mice. Cancer Res. 39, 3220-3224 (1979)

Pruitt SC: Expression vectors permitting cDNA cloning and enrichment for specific sequences by hybridization/selection. Gene 66, 121-134 (1988)

Rosenfeld C, Venuat AM, Goutner A, Guégang J, Choquet C, Tron F, Pico JL: An exceptional cell line established from a patient with acute lymphoid leukemia. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 16, 1075 (1975)

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning. A laboratory manual. Second edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5471 (1977)

Takaue Y, Reading CL, Roome AJ, Dicke KA, Tindle S, Chandran M, Devaraj B: Limiting-dilution analysis of the effects of colony-stimulation factors, phytohemagglutinin, and hydrocortisone on hematopoietic progenitor cell growth. Blood 70, 1611-1618 (1987)

Thalmeier K, Meißner P, Reisbach G, Falk M, Brechtel A, Dörmer P: Establishment of two permanent human bone marrow stromal cell lines with long-term post irradiation feeder capacity. Blood 83, 1799-1807 (1994)

Uyttenhove C, Simpson RJ, Van Snick J: Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6934-6938 (1988)

Warner NL, Moore MAS, Metcalf D: A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB/c mice: cytology, karyotype and muramidase content. J. Natl. Cancer Inst. 43, 963 (1979)